



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE FÍSICAS E MATEMÁTICAS – CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ESTÁGIO SUPERVISIONADO – QMC 5510



Imobilização de Lipases em Filmes de Gelatina: Aplicação na Síntese de Ésteres de Aroma

Aluna: Rosana Oliveira Henriques

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento

Co-orientadora: Cristiane Pilissão

Florianópolis, 5 de junho de 2008.

AGRADECIMENTOS

- ✓ A Universidade Federal de Santa Catarina, pelo espaço físico fornecido.
- ✓ Ao CNPq e CAPES, pelo suporte e apoio financeiro.
- ✓ A Amano e a Novozymes, pela doação das enzimas.
- ✓ A Central de Análises, pelas várias análises realizadas.
- ✓ A minha orientadora, Profa. Dra. Maria da Graça Nascimento e co-orientadora Cristiane Pilissão, por toda dedicação, paciência e confiança depositada em mim.
- ✓ Aos professores do Departamento de Química pela minha formação acadêmica
- ✓ Aos amigos do laboratório de Biocatálise, Cris, Vanessa, Geovanni, Flá, Marcelo, Daniel, Tiaguinho, Dam, Isa , Thiago e André por toda ajuda e amizade.
- ✓ Ao meu pai Luiz Roberto e minha irmã Marília pela parceria, companheirismo, confiança e amizade.
- ✓ A todos os amigos que conviveram e de alguma forma fizeram parte desta trajetória.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL.....	III
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	VII
RESUMO.....	IX
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Lipases.....	xii
1.2- Métodos de Imobilização de Enzimas	xiii
1.3- Gelatina.....	xv
1.4- Compostos Terpenóides.....	xvii
1.5- Ácidos Graxos.....	xviii
2- OBJETIVOS.....	XX
2.1 Objetivo Geral	xx
2.2 Objetivos Específicos	xx
3- EXPERIMENTAL	XXI
3.1- Reagentes Solventes e Enzimas Utilizadas	xxi
3.2- Equipamentos	xxii
3.3- Reações Estudadas	xxii
3.4- Preparação dos Suportes	xxiii
3.5- Preparação do Meio Reacional e Identificação dos Produtos	xxiv

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	XXVIII
4.1 Composição e Estabilidade do Filme de Gelatina:.....	xxviii
4.2- Efeito do Solvente Orgânico no Filme de Gelatina	xxx
4.3- Efeito da Temperatura	xxx
4.4- Preparação do Acetato de Citroneila com Lipases na Forma Livre e Imobilizada em Reações de Transesterificação	xxxii
4.4.1 - Efeito da Reutilização dos Sistemas Lipases/Gelatina.....	xxxiii
4.5. Preparação de Alcanoatos de Citroneila com Lipases Imobilizadas em Reações de Esterificação	xxxv
4.5.1-Efeito do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos alifáticos na preparação de alcanoatos de citroneila	xxxv
4.5.2- Efeito da Reutilização dos Sistemas LPS/gelatina na Reação de Esterificação dos Ácidos Alifáticos	xxxvi
4.6. Esterificação de Ácidos Alifáticos com o Álcool Benzílico.....	xxxviii
4.6.1. Efeito da polaridade do solvente orgânico na preparação de alcanoatos de benzila.....	xxxviii
4.6.2 . Efeito da Utilização de Diferentes Lipases na Obtenção dos Alcanoatos de Benzila	xxxix
4.7. Tratamento dos Resíduos e dos Produtos.....	xli
5- CONCLUSÕES	XLII
6- PERSPECTIVAS	XLII
7- REFERÊNCIAS	XLIII

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: MODELO ESQUEMÁTICO DA PURINA ²	X
FIGURA 2: MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS (ADAPTADO DA REF. 5).....	XIV
FIGURA 3- FILMES DE GELATINA COM LIPASE (50 MG/LPS) IMOBILIZADA.....	XV
FIGURA 4:ESTRUTURA PARCIAL DA GELATINA SALIENTANDO OS RESÍDUOS DE GLICINA, PROLINA E 4-HIDROXIPROLINA. A SEQUÊNCIA TÍPICA É: ALA-GLY-PRO-ARG- GLU-4HYP-GLY-PRO-GLY-PRO	XVI
FIGURA 5- ESTRUTURA QUÍMICA DO GLICEROL E SORBITOL	XVII
FIGURA 6: ESTRUTURAS DO CITRONELOL (1), ACETATO DE CITRONEILA (2) , E ALCONOATOS DE BENZILA (3).	XVIII
FIGURA 7- PREPARAÇÃO DO FILME DE GELATINA E IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES.	XXIV
FIGURA 8- PLACA CROMATOGRÁFICA DELGADA MOSTRANDO OS RESULTADOS DA REAÇÃO DO CITRONELOL COM ACETATO DE VINILA CATALISADA POR 20MG DE LPS/GELATINA.	XXV
FIGURA 9- PREPARAÇÃO DO MEIO REACIONAL E ANÁLISE DOS PRODUTOS.....	XXVI
FIGURA 10- ESPECTRO DE RMN ¹ -H, OBTIDO NA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DO ÁLCOOL BENZÍLICO COM O ÁCIDO PROPIONICO, FORMANDO O PROPIONATO DE BENZILA COM 84,75% DE CONVERSÃO. (400 MHZ, CDCL ₃).....	XXVII
FIGURA 11- CONVERSÃO EM ACETATO DE CITRONEILA NA PRIMEIRA UTILIZAÇÃO E PRIMEIRA REUTILIZAÇÃO DOS SISTEMAS LPS/GELATINA (A) E LRO/GELATINA (B) (96H, 35°C).....	XXXIV
FIGURA 12 - CONVERSÃO EM ALCANOATO DE CITRONEILA EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CARBONOS NOS ÁCIDOS, LPS (50MG), 48H, 35°C.	XXXV
FIGURA 13- CONVERSÃO EM ALCANOATOS DE CITRONEILA NA PRIMEIRA UTILIZAÇÃO COMPARADA COM A PRIMEIRA REUTILIZAÇÃO, LPS (50MG), 48H, 35°C.	XXXVII

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO DO ACETATO DE VINILA COM CITRONELOL.....	XXII
ESQUEMA 2– REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE DIFERENTES ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COM CITRONELOL.	XXII
ESQUEMA 3- REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO DE DIFERENTES ÁCIDOS CARBOXÍLICOS COM ÁLCOOL BENZÍLICO.....	XXIII

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1- INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DA MASSA DE GELATINA COMERCIAL NA FORMAÇÃO DO FILME.	XXVIII
TABELA 2- PORCENTAGEM DE H₂O PRESENTE NOS FILMES DE GELATINA DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES.	XXIX
TABELA 3- CONVERSÃO EM ACETATO DE CITRONEILA COM A LPS/GELATINA E LRO/GELATINA.	XXXI
TABELA 4: CONVERSÃO EM ACETATO DE CITRONEILA COM LIPASES LIVRES^(A).	XXXII
TABELA 5- CONVERSÃO EM ALCONOATOS DE BENZOÍLA EM FUNÇÃO DA POLARIDADE DOS SOLVENTES ORGÂNICOS.	XXXVIII
TABELA 6- UTILIZAÇÃO DE LIPASES DE DIFERENTES PROCEDÊNCIA NA OBTENÇÃO DOS ALCONOATOS DE BENZILA	XL

RESUMO

As lipases, enzimas hidrolíticas, podem ser empregadas como catalisadores em reações de esterificação, transesterificação e hidrólise de trigliceróis. Estes biocatalisadores podem ter seu uso comprometido pela possibilidade de perda da ação catalítica, resultado da desnaturação da enzima. Este problema pode ser contornado com a utilização de métodos de imobilização.

Inicialmente, foram realizados testes de estabilidade do filme de gelatina de diversas procedências em heptano, hexano, éter metil t-butílico (MTBE), clorofórmio, acetonitrila, diclorometano e etanol para determinar a potencialidade de utilização do mesmo como suporte de enzimas em reações biocatalisadas. Os filmes mantiveram suas características macroscópicas em todos os solventes após 24h e quando submetidos a temperaturas até aproximadamente 60°C durante ~40 min. em *n*-hexano.

A seguir, as lipases de *Pseudomonas* sp. (*Rhizopus oryzae*), *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus* foram imobilizadas em filmes de gelatina. Todos os sistemas foram utilizados como catalisadores para as reações de transesterificação e esterificação em meio orgânico. Utilizou-se o citrônolol, um álcool monoterpênico e o acetato de vinila obtendo-se como produto, o acetato de citroneila, e uma série de ácidos carboxílicos (contendo de 3 a 18 carbonos) para a obtenção de alcanoatos de citroneila. Utilizou-se também o álcool benzílico nas reações de esterificação para a obtenção de alcanoatos de benzila. Os produtos foram obtidos em conversões de 11,5-44,6% (acetato de citroneila), 18-70% (alcanoatos de citroneila) e 4-99% (alcanoatos de benzila).

Todas as reações foram efetuadas em banho termostatizado do tipo Dubnoff usando como solvente externo hexano, heptano, clorofórmio e acetonitrila por 48-96h. A formação e identificação de todos os produtos foram feitas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio- RMN-H¹, infra-vermelho (IV) e cromatografia de camada delgada (ccd).

Palavras-chave: Imobilização, lipases, ésteres terpênicos.

1- INTRODUÇÃO

Enzimas são, em geral, catalisadores de origem protéica que atuam em uma série de reações biológicas que ocorrem em organismos vivos, em condições favoráveis de temperatura e pH aumentando de forma considerável a velocidade das reações.

As enzimas foram descobertas no século XIX, aparentemente por Pasteur, que concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por fermentos. Ele postulou que esses fermentos (as enzimas) eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo.¹ Em 1926, James Summer's isolou a primeira enzima conhecida, a urease, que catalisa a hidrólise da uréia em NH_3 e CO_2 mostrando que este cristal era de natureza protéica.

A **Figura 1**, mostra uma representação esquemática da estrutura tridimensional da Purina, um nucleósido fosforilase (PNP) gerado por computador.²



Figura 1: Modelo esquemático da Purina. ²

A estrutura das enzimas é formada por longas cadeias de aminoácidos ligados entre si através de ligações peptídicas. Porém existem algumas moléculas de RNA, as ribozimas, que são de ocorrência mais remota que as proteínas catalíticas e atuam também como catalisadores biológicos.^{3, 4}

As principais propriedades das enzimas que as caracterizam como catalisadores para biotransformações são: ^{4, 5}

- ✓ Aumentam a velocidade das reações em 10^6 a 10^{12} vezes mais em relação às não catalisadas.
- ✓ Em geral, as reações ocorrem em condições suaves de temperatura (20° - 40°C), sob pressão atmosférica e na faixa de pH de 5-8.
- ✓ Apresentam seletividade como, por exemplo, quimiosseletividade, regioseletividade, diastereoseletividade e enantioseletividade.
- ✓ A atividade catalítica pode variar de acordo com a concentração do substrato, produto ou outras espécies do meio reacional.

As enzimas são classificadas em seis grupos: ^{3, 4}

- ✓ **Oxidoredutases:** catalisam reações de oxi-redução.
- ✓ **Transferases:** catalisam reações de transferência de grupos como acila. açúcares, fosforila e aldeído ou cetona de uma molécula para outra.
- ✓ **Hidrolases:** catalisam reações de hidrólises.
- ✓ **Liases:** catalisam reações de adição, geralmente com HX a dupla ligação ou formação de duplas ligações por remoção de grupos.
- ✓ **Isomerases:** catalisam a transferência de grupos dentro da molécula produzindo apenas um isômero.
- ✓ **Ligases:** catalisam a formação de ligações C-O, C-S, C-C e de ésteres de fosfato.

1.1- Lipases

As lipases são enzimas hidrolíticas presentes em diversos organismos incluindo animais, plantas, fungos e bactérias.^{5,6} Atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases. Além de funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia.^{7,8,9} Como exemplo de lipases, podemos citar a de *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp, *Bacillus megaterium* produzidas por fungos, a de *Pseudomonas* sp , *Achhromobacter* sp e *Staphylococcus* sp. produzidas por bactérias. e as de *Tulopsis* sp e *Candida* sp produzidas por leveduras.⁶

As lipases possuem uma grande utilização em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso, não requerem cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio, apresentam especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem a habilidade de catalisar reações de esterificações, transesterificações (acidólise, interesterificação, alcoolise), aminólise e tiotransesterificação em solvente orgânico anidro, sistema bifásico e em solução micelar com alta especificidade.^{3,5} As lipases tem sido extremamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e mais recentemente para aplicações industriais^{9,10,11,12} , sendo crescente a publicação de trabalhos desenvolvendo e aplicando essas características.

Como alguns exemplos de pesquisas utilizando esses biocatalisadores, pode-se citar Gotor e col. que utilizaram a lipase de *Cândida antartica* (CALB) na preparação de álcoois e aminas como isômeros únicos, obtendo fármacos quirais de grande interesse na indústria farmacêutica.¹²

Dalla-Vecchia e col. também testaram lipases de diferentes procedências imobilizadas em filmes de carboximetilcelulose (CMC), álcool poli-vinílico (PVA) e blendas de CMC/PVA em reações de esterificação do ácido láurico com o n-pentanol. Os ésteres foram obtidos com conversões de até 99%, comprovando a eficiência desses biocatalisadores.¹³

Porém algumas desvantagens estão relacionadas com a utilização de enzimas como catalisadores, em especial em meio orgânico.^{5,14, 15}

- ✓ Não possuem estabilidade suficiente em condições reacionais, podendo perder a atividade catalítica quando submetidas a altas temperaturas, auto-oxidação, autodigestão e desnaturação pelo solvente.
- ✓ Podem sofrer inibição por agentes químicos e físicos.
- ✓ Ainda tem um alto custo.

Atualmente para minimizar estes problemas, vem-se recorrendo a métodos de imobilização.

1.2- Métodos de Imobilização de Enzimas

Os métodos de imobilização de enzimas são processos que oferecem vantagens considerando que em geral, aumentam a estabilidade do biocatalisador e são economicamente viáveis. A biocatalisador imobilizado pode ser facilmente recuperado e reutilizado, proporcionando, algumas vezes, um aumento da atividade enzimática.^{5,7,16,17} A **Figura 2**, mostra os principais métodos de imobilização de enzimas.

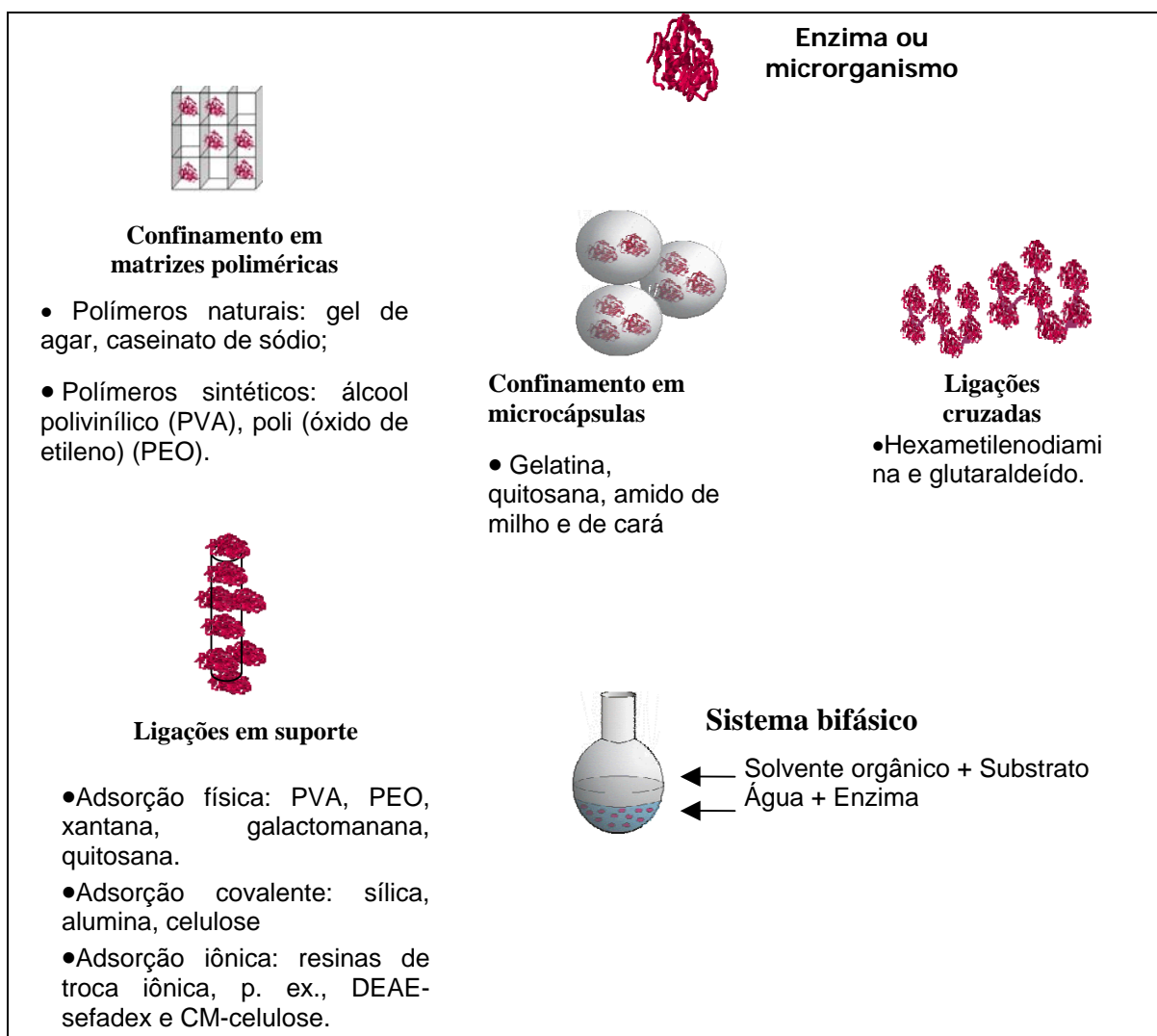


Figura 2: Métodos de imobilização de enzimas (adaptado da ref. 5)

Dos métodos demonstrados na **Figura 2**, pode-se destacar o de confinamento em matrizes poliméricas. Este método consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel, criando uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. A técnica apresenta a vantagem de não interagir quimicamente com o polímero, evitando assim a desnaturação.^{13,15} Como exemplo de alguns polímeros utilizados neste método, pode-se citar o amido, caseinato de sódio, polissulfonato de sódio (PSS), polioxido de etileno (PEO) além da gelatina, que foi utilizada neste trabalho.¹³

1.3-Gelatina

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno, em que as ligações moleculares naturais entre fibras separadas de colágeno são quebradas, permitindo seu rearranjo. Forma uma cadeia de três moléculas polipeptídicas arranjadas em forma de hélice. A gelatina funde com o aumento da temperatura e solidifica-se quando o calor cessa, sendo classificada como um gel termorreversível com ponto de fusão próximo a 25°-35°C.¹⁸

A gelatina possui uma forte habilidade de ligação com água, e suas cadeias de formação helicoidal são importantes para a formação do gel.

Por ser um hidrocolóide de origem protéica possui caráter anfótero, associado à presença de grupos amina e carboxílicos nos aminoácidos.

Na indústria é utilizada como coberturas de cápsulas farmacêuticas, cosméticos, indústria de alimentos e como suporte de enzimas. A comercialização da gelatina é feita de acordo com sua habilidade em formar gel, sendo graduadas em termos de “Bloom” ou força de gelificação. A **Figura 3** mostra a gelatina em forma de filmes utilizado como suporte para lipases.



Figura 3- Filmes de gelatina com lipase (50 mg/LPS) imobilizada.

Existe uma relação entre força de gel e concentração de gelatina, sendo possível produzir géis com firmezas variáveis com diversos tipos de Bloom, somente variando a concentração do agente gelificante.¹⁹

A **Figura 4** mostra a estrutura da gelatina contendo os resíduos de aminoácidos.²⁰

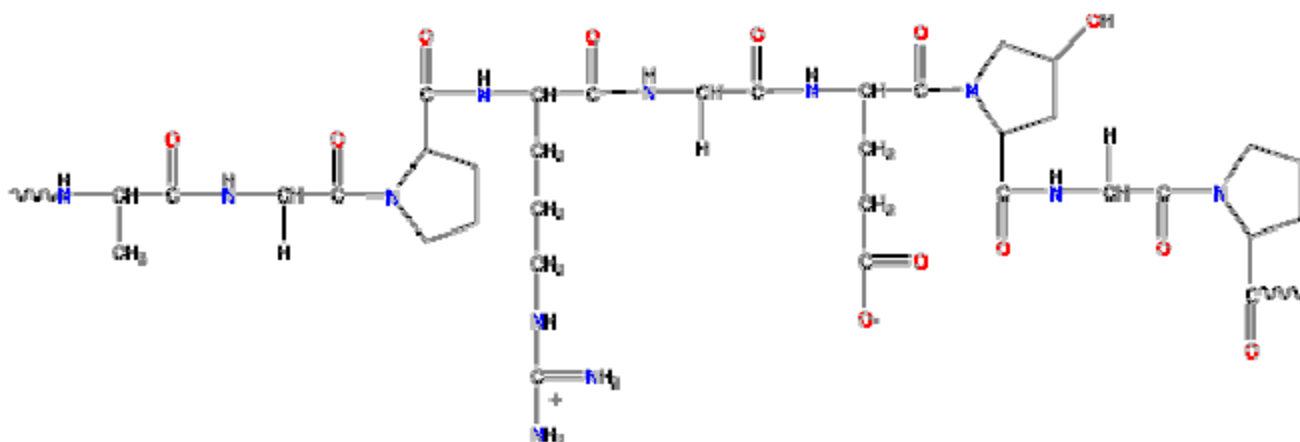


Figura 4: Estrutura parcial da gelatina salientando os resíduos de glicina, prolina e 4-hidroxiprolina. A sequência típica é: Ala-Gly-Pro-Arg-Glu-4Hyp-Gly-Pro-Gly-Pro

A gelatina preparada em forma de filmes como suporte para lipases pode ser combinada com agentes plastificantes a fim de melhorar características destes filmes tornando-os mais maleáveis e resistentes. O sorbitol (1) e o glicerol (2) são dois compostos que apresentam esta funcionalidade e suas estruturas químicas estão demonstradas na **Figura 5**. Estes foram também empregados juntamente com a gelatina na preparação dos suportes utilizados neste trabalho como catalisadores para reações de transesterificação e esterificação de terpenos.

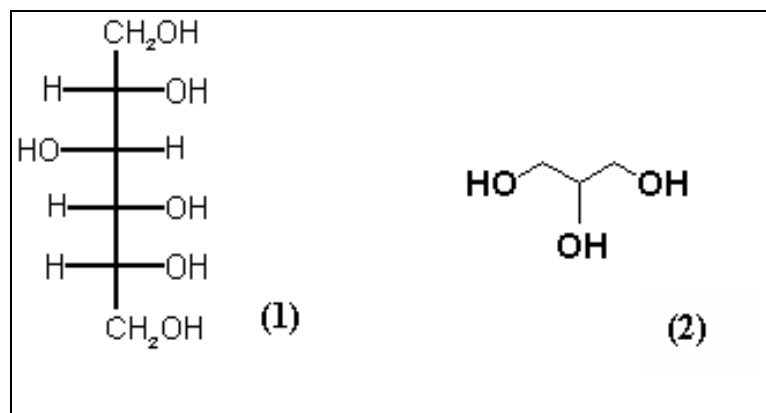


Figura 5- Estrutura química do sorbitol (1) e do glicerol (2).

1.4- Compostos Terpenóides

Os compostos terpenóides, representados pela fórmula geral $\text{C}_{10}\text{H}_{15}$, representam a segunda maior classe de compostos naturais com maior número de constituintes ativos. São divididos em várias subclasses de acordo com as unidades de carbono e as várias formas de ciclização, sendo monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos e tetraterpenos.

Os monoterpenos representam à subclasse que inclui compostos de ocorrência comum tais como citral, linalol, cânfora, terpinen-4-ol, carvacrol, citronelol, geraniol, entre outros.²¹

No grupo dos terpenos estão incluídos compostos como os álcoois, que podem sofrer reações de esterificação e transesterificação formando ésteres, presentes em muitos óleos essenciais, utilizados na indústria de essências e fragrâncias, surfactantes e shampoos e conhecidos por suas propriedades flavorizantes e aromatizantes.^{22,23.}

Nesse trabalho, utilizou-se o citronelol para obtenção do acetato e de alcanos de citrônio. A **Figura 6** mostra as estruturas do citronelol (3), um álcool monoterpênico, do mentol (4) e do geraniol (5), todos constituídos por 10 carbonos

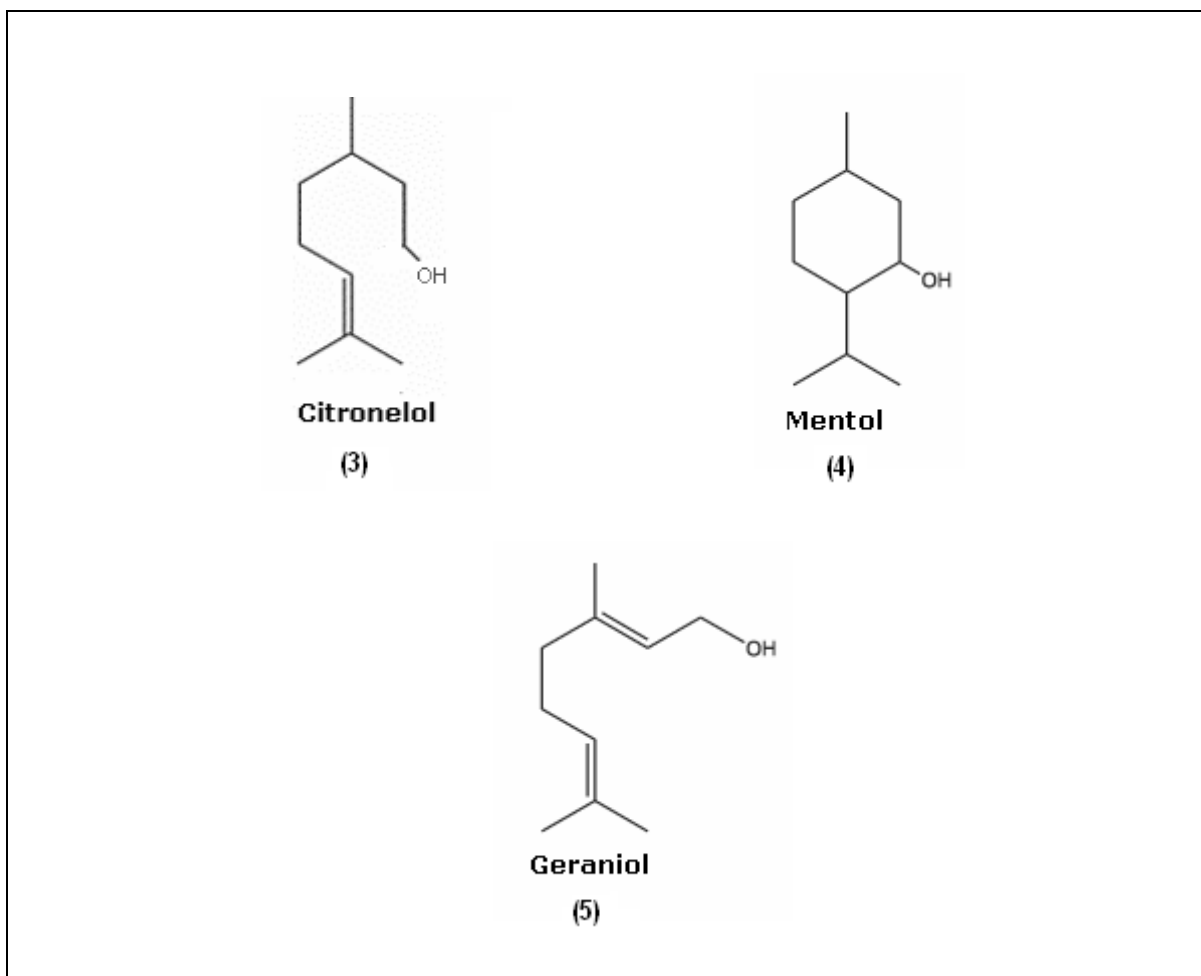


Figura 6: Estruturas do citronelol (3), mentol (4) e do geraniol (5).

Uma outra classe de compostos que serão utilizados neste trabalho são os ácidos graxos, utilizados nas reações de transesterificação e esterificação.

1.5-Ácidos Graxos

Ácidos graxos ou **ácidos gordurosos** são ácidos monocarboxílicos de cadeia normal que apresentam o grupo carboxila ($-\text{COOH}$) ligado a um radical alquila de cadeia saturada ou insaturada. Como nas células vivas dos animais e vegetais os ácidos graxos são produzidos a partir da combinação de *acetilcoenzima*. A estrutura destas moléculas contém números pares de átomos de carbono, mas existem também ácidos graxos com número de carbonos ímpares, apesar de ser mais raro.

Ácidos graxos saturados com até 9 átomos de carbono são líquidos. Acima de 9 carbonos, os saturados são sólidos e os insaturados são líquidos. Todo o ácido graxo possui certa hidrofobicidade, ou seja, não é solúvel em água, já que a maior parte da cadeia é apolar e incapaz de formar ligações intermoleculares fortes com as moléculas de água. A solubilidade em água diminui com o aumento da cadeia do ácido. Eles tendem a se agregar, fazendo a menor superfície de contato possível com a água, já que este é o estado menos energético. Essa propriedade possibilita a formação das membranas biológicas, importantíssimas para a evolução da vida na Terra.²⁴

2-OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizar a gelatina como suporte para imobilização de lipases e aplicar estes sistemas na síntese dos ésteres de aroma acetato de citroneíla e alcanato de citroneíla e benzila em solvente orgânico.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar filmes de gelatina (comercial, farmacêutica, de pele de porco e de boi);
- ✓ Avaliar macroscopicamente a estabilidade dos filmes em diversos solventes orgânicos tais como hexano, diclorometano, etanol, clorofórmio, MTBE, heptano e acetonitrila
- ✓ Imobilizar as lipases de *Pseudomonas* sp. (LPS) *Rhizopus oryzae* (LRO), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Burkholderia cepacia* (PS-SD e PS-IM), *Aspergillus niger* (A), *Candida rugosa* (AY), *Mucor javanicus* (M) nos filmes de gelatina;
- ✓ Avaliar a capacidade catalítica dos sistemas em função da massa de LPS e LRO (20-70 mg);
- ✓ Reutilizar os sistemas e comparar com as lipases na forma livre (não imobilizada).
- ✓ Avaliar a influência do tamanho da cadeia alquílica de ácidos carboxílicos alifáticos nas reações de esterificação com o citrionelol, utilizando as lipases imobilizadas ou não em filmes de gelatina.
- ✓ Testar os sistemas gelatina/lipase em reações de esterificação com o álcool benzílico;
- ✓ Avaliar a influência do solvente orgânico de diferentes polaridades na reação de esterificação catalisada pelos sistemas gelatina/lipase;
- ✓ Determinar a formação dos produtos por espectroscopia de RMN- H^1 , IV e ccd;
- ✓ Comparar os resultados obtidos com dados reportados na literatura.

3-EXPERIMENTAL

3.1-Reagentes Solventes e Enzimas Utilizadas

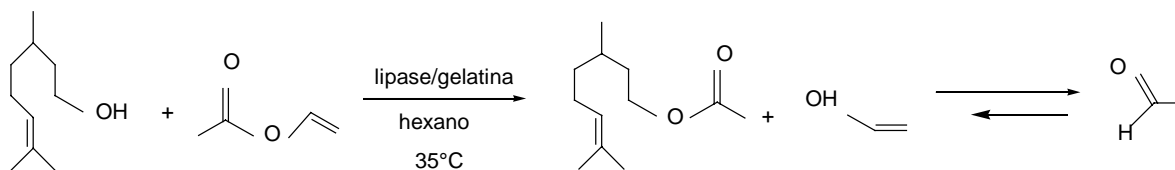
- ✓ Gelatina em pó G-2500. 300 Bloom (Sigma);
 - ✓ Gelatina em pó farmacêutica (All Chemistry do Brasil);
 - ✓ Gelatina da pele de boi (comercial);
 - ✓ Gelatina da pele de porco (comercial);
 - ✓ Plastificantes: glicerol (Reagen); sorbitol (Vetec Química Fina)
 - ✓ Sílica para cromatografia de camada delgada (60 HF 254 da Merck);
 - ✓ Solventes: hexano (F.Maia), acetato de etila (G. Química), etanol (F.Maia), diclorometano (Nuclear); heptano (G. Química); acetonitrila (G. Química); éter metil t-butílico (MTBE- Tedia Company) , clorofórmio (Vetec)
 - ✓ Álcoois: citronelol (Acros Organics); álcool benzílico (J.T Baker Chemical CO.)
 - ✓ Acetato de vinila (Fluka Chemica);
 - ✓ Ácidos: propiônico (Vetec); butírico (Vetec.); hexanóico (Aldrich Chemical Company); caprílico (Vetec); decanóico (Fluka); láurico (Vetec); palmítico (Aldrich Chemical Company); esteárico (Vetec) ; oléico (Vetec).
 - ✓ Lipases: *Rhizopus oryzae* (LRO, 150,000u/g), *Pseudomonas* sp. (LPS 30,000u/g) , *Pseudomonas fluorescens* (AK , 26,600 U/g), *Burkholderia cepacia* (PS-SD, 32,200 U/g e PS-IM, 735 U/g), *Aspergillus niger* (A, 120,000 u/g), *Candida rugosa* (AY, 30,000 u/g), *Mucor javanicus* (M , 10,000 u/g), todas da Amano Pharmaceutical CO (Japão).^{25, 26}
- Para a LPS e a LRO, uma unidade de atividade lipolítica é definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácido graxo por minuto, utilizando-se o óleo de oliva como substrato.²⁶

3.2- Equipamentos

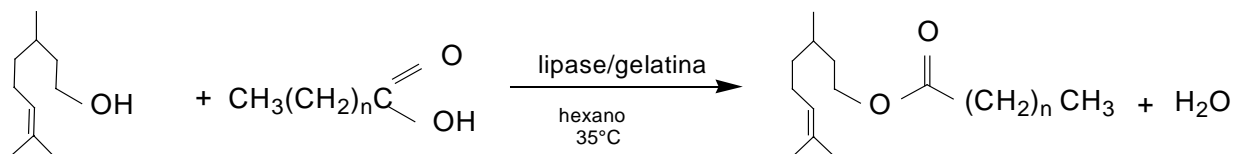
- ✓ Espectrômetro de RMN-¹H, VARIAN AC400F (400MHz);
- ✓ Espectrofotômetro da Perkin Elmer , FT-16-PC;
- ✓ Titulador 633 Automático Karl Fischer, Metrohm AG CH-9100 Herisau;
- ✓ Agitador com banho termostático , tipo Dubnoff da Marconi HW2000;
- ✓ Rotaevaporador Büchi 461.

3.3- Reações Estudadas

Neste trabalho foram efetuadas as reações de transesterificação do acetato de vinila com citrônol (Esquema 1) e de esterificação dos ácidos butírico, propiônico, hexanoico, caprílico, cáprico, láurico, esteárico e palmítico, primeiramente com citrônol (Esquema 2). Em uma segunda etapa foram preparados uma série de ésteres derivados do álcool benzílico, (Esquema 3). Todas as reações foram catalisadas por lipases imobilizadas em filmes de gelatina.

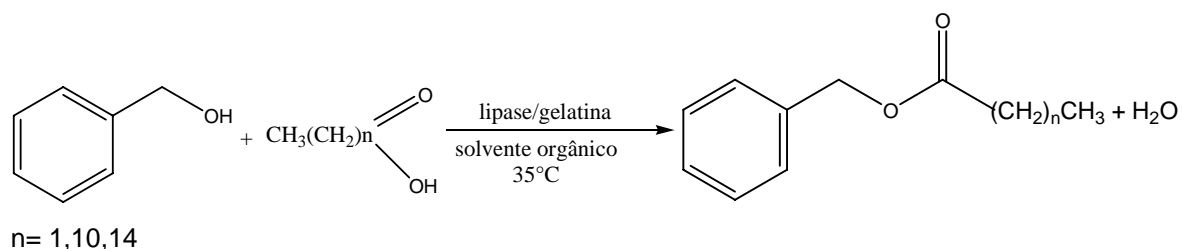


Esquema 1: Reação de transesterificação do acetato de vinila com citrônol.



$n = 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16$

Esquema 2- Reação de esterificação de diferentes ácidos carboxílicos com citrônol.



Esquema 3- Reação de esterificação de diferentes ácidos carboxílicos com álcool benzílico

3.4- Preparação dos Suportes

Em um béquer dissolveram-se 1,0g de gelatina em pó de diversas procedências em 20 mL de água destilada em aquecimento em torno de 60°C até a total dissolução (~ 5 min.) juntamente com 0,3 mL de glicerol ou 0,3 g de sorbitol como agente plastificante. Após a dissolução esperou-se a diminuição da temperatura até ~30°C para a adição das lipases em massas variadas (10-100 mg). As lipases foram dissolvidas em 2 mL de água destilada e misturadas com a solução de gelatina, agitando até a obtenção de uma mistura homogênea.

As soluções foram colocadas em placas de Petri e a seguir sobre um sistema de aquecimento brando em temperaturas não superiores a 30°C até a evaporação da água e obtenção do filme.

Para os estudos de estabilidade do filme em diferentes solventes orgânicos (hexano, diclorometano, etanol, heptano, acetonitrila, éter metil t-butílico - MTBE, e clorofórmio) e de termoestabilidade, utilizou-se filme de gelatina sem adição do biocatalisador.

A **Figura 7** mostra o procedimento utilizado para a preparação do filme de gelatina.

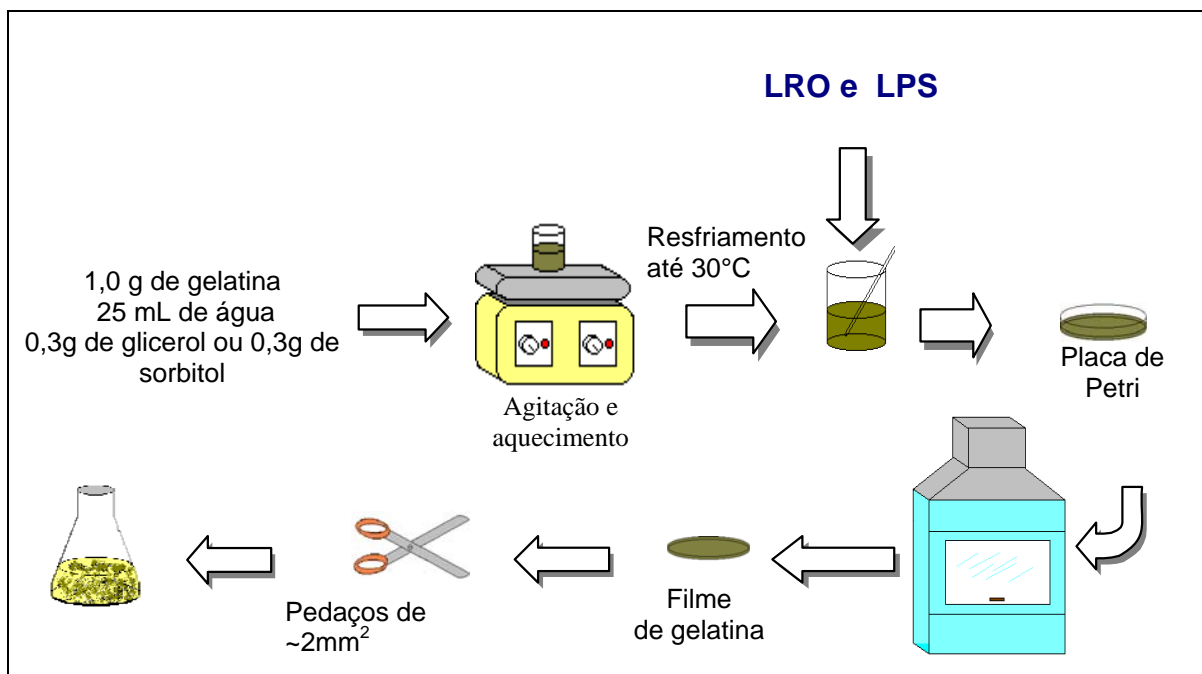


Figura 7- Preparação do filme de gelatina e imobilização das lipases.

3.5-Preparação do Meio Reacional e Identificação dos Produtos

Os filmes de gelatina com as lipases imobilizadas foram cortados em pequenos pedaços e colocados em um erlenmeyer com 25mL de solvente (hexano, heptano, MTBE, clorofórmio ou acetonitrila).

Nas reações de transesterificação e esterificação, os reagentes foram adicionados na razão equimolar de 1:1. Na reação de transesterificação utilizou-se 5 mmol de acetato de vinila e 5 mmol de citronelol. Na reação de esterificação dos ácidos alifáticos utilizaram-se dois álcoois distintos, o citronelol e o álcool benzílico.

Os sistemas foram submetidos à agitação suave em banho termostatizado tipo Dubnoff a 35°C por 96 h na reação de transesterificação e 24-48h na de esterificação.

No decorrer das reações foram realizadas análises de cromatografia de camada delgada (ccd) para verificar a formação dos produtos. Como fase fixa utilizou-se de sílica gel, e como eluente uma mistura de hexano/acetato de etila

em razão 7:3. Os valores de Rf (índice de retenção) encontrados para o acetato de citroneila variaram entre 0,54-0,80. A **Figura 8** ilustra uma placa cromatográfica mostrando as manchas referentes ao citrônol e ao produto formado (acetato de citroneíla). Este resultado foi obtido na reação do citrônol com acetato de vinila, catalisada por 20mg de LPS imobilizada em filme de gelatina, após 24h a 35°C.

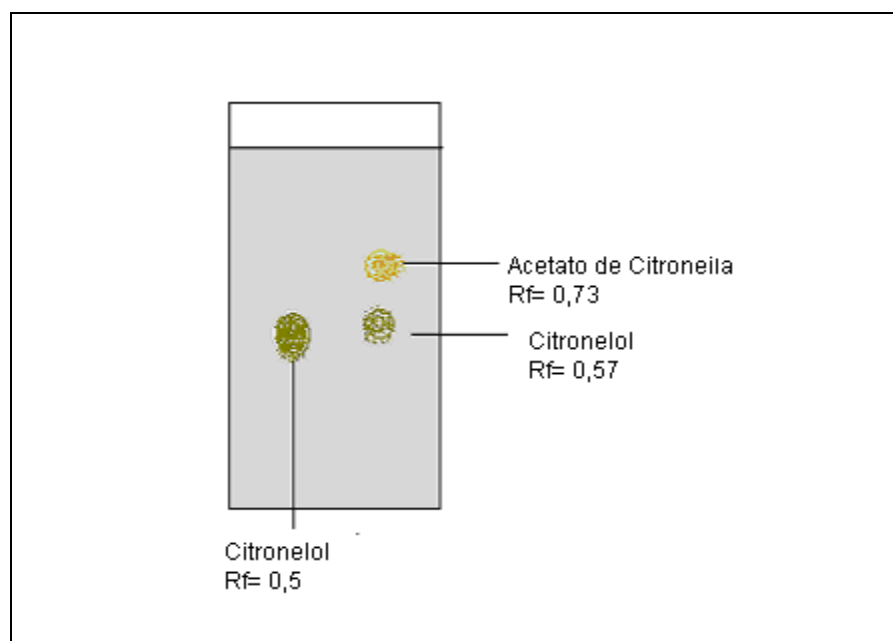


Figura 8- Placa cromatográfica delgada mostrando os resultados da reação do citrônol com acetato de vinila catalisada por 20mg de LPS/gelatina.

Após o término das reações, separou-se o produto e os substratos do suporte por decantação, lavando o suporte várias vezes com o solvente orgânico utilizado para remover os reagentes remanescentes e o produto formado. Os suportes foram armazenados em para posterior reutilização.

A **Figura 9** ilustra a preparação do meio reacional e a análise dos produtos.

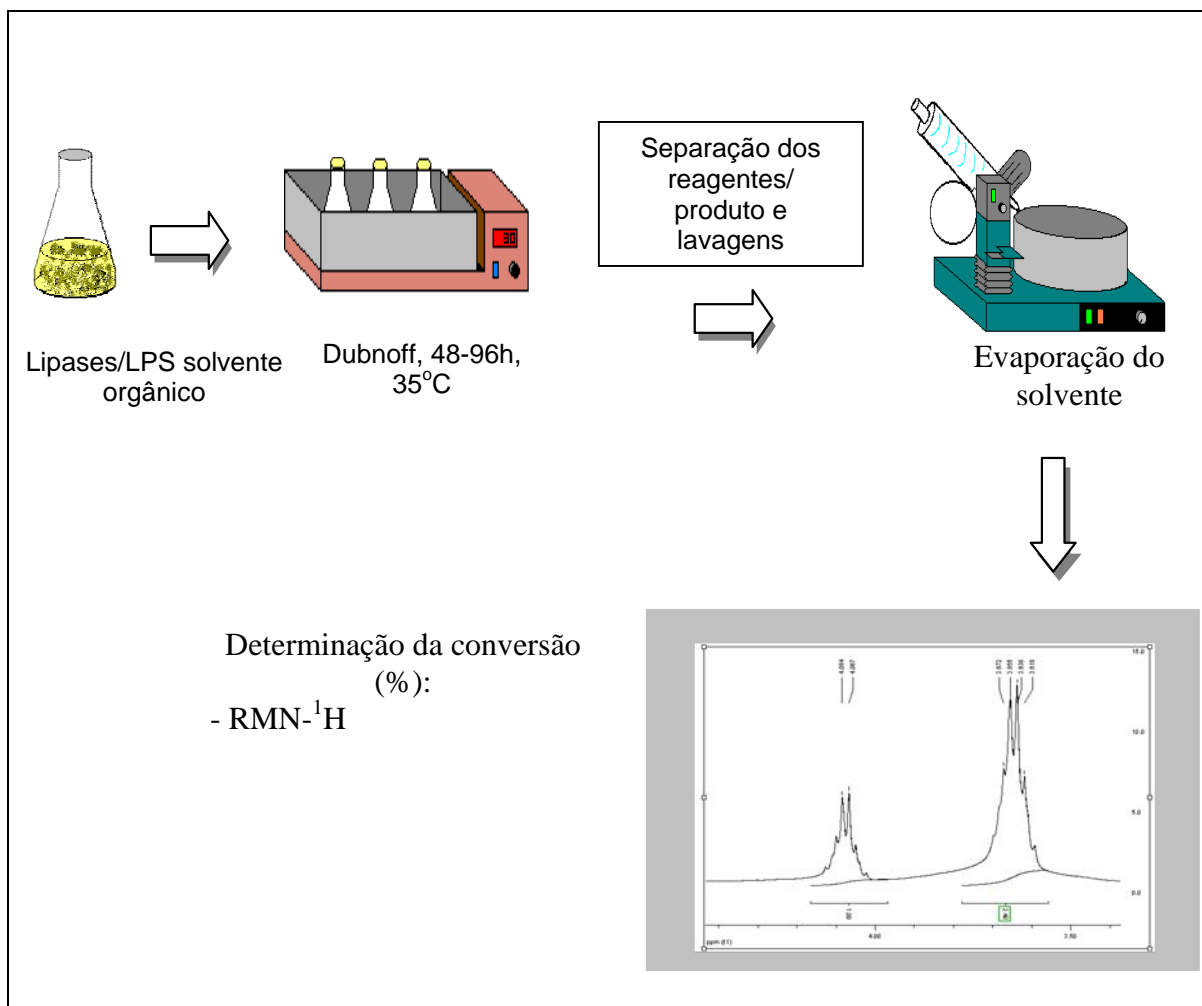


Figura 9- Preparação do meio reacional e análise dos produtos.

Os produtos foram separados do solvente utilizando um rota-evaporador (marca Büchi) e posteriormente quantificados e caracterizados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹-H) e de infra-vermelho (IV).

A **Figura 10**, mostra o espectro de RMN¹-H, salientando os picos característicos dos prótons metilênicos do álcool benzílico em ~4,6ppm e do produto obtido, o propionato de benzila em ~5,1ppm onde a conversão ao produto foi de 84,7% em 48h de reação .

A conversão ao produto no espectro foi calculada a partir da razão entre a área dos picos referentes aos prótons metilênicos do propionato de benzila dividido pela soma deste com a área referente aos prótons metilênicos do álcool, multiplicado por 100.

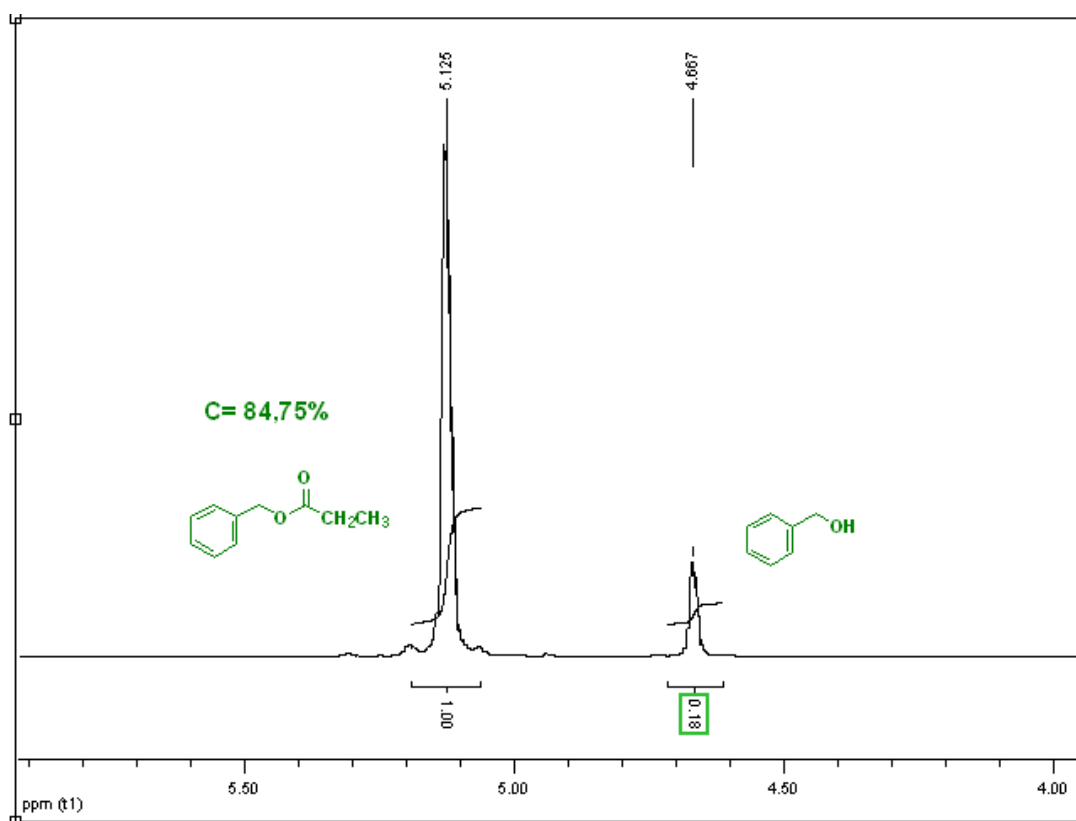


Figura 10- Espectro de RMN¹-H, obtido na reação de esterificação do álcool benzílico com o ácido propiônico, formando o propionato de benzila com 84,75% de conversão. (400 MHz, CDCl₃)

Para a obtenção do acetato de citroneila, os picos são observados em ~3,5 ppm para os prótons metilênicos do citrônolol e em ~4,0 ppm para os prótons metilênicos do respectivo produto (éster).

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição e Estabilidade do Filme de Gelatina:

Primeiramente, realizaram-se testes para definir a melhor composição para a obtenção dos filmes. Foram usadas massas entre 0,50-1,25 g de gelatina e 0.1-0,5g do agente plastificante (glicerol ou sorbitol). Foram testadas as gelatinas comercial, farmacêutica, de pele de boi e de porco.

Os resultados das características dos filmes sem a adição de plastificante estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1-Influência da variação da massa de gelatina comercial na formação do filme.

Massa gelatina(g) ^(a)	Características
0,5	Não formou o filme
0,75	Filme fino de difícil remoção da placa
1,00	Filme fino e seco
1,25	Filme sem consistência, em forma de gel

(a) gelatina comercial da Sigma

A melhor composição foi obtida com 1,0g de gelatina comercial, formando um filme consistente e fino. Com 0,5g não houve a formação de um filme que pudesse ser removido da placa de Petri. Com 0,75 g, obteve-se um filme fino e também de difícil remoção. Com quantidades maiores, como por exemplo com 1,25g, obteve-se um filme sem consistência. A quantidade de água utilizada foi de 25mL.

Os filmes preparados, mesmo apresentando uma boa consistência, apresentaram-se um pouco quebradiços, dificultando o seu uso como suporte para utilização nas reações biocatalisadas.

Para melhorar as características dos filmes, testou-se a utilização de glicerol ou sorbitol como agente plastificante obtendo-se filmes menos quebradiços e mais plásticos. Os volumes de glicerol testados variaram entre 0,1-0,5mL. O volume de glicerol selecionado foi de 0,3mL sendo que abaixo desta

quantidade não houve mudanças significativas no aspecto final do filme, e acima deste o filme ficou muito grudento. Com o sorbitol testaram-se massas entre 0,1-0,3g, obtendo-se os filmes menos quebradiços, menos aderentes e portanto mais maleáveis. A partir desta análise, o sorbitol foi selecionado como agente plastificante utilizando uma massa de 0,3 g .

O teor de água presente nos filmes foi determinado através do método de titulação de Karl-Fischer. Avaliaram-se os filmes nas composições 1,0g gelatina /0,2g glicerol, 1,0g gelatina/0,3 g glicerol e 1,0g gelatina (todos preparados com gelatina da Sigma e 1,0g de gelatina farmacêutica).

Os resultados obtidos do teor de água presente nos filmes estão demonstrados na **Tabela 2**.

Tabela 2- Porcentagem de H₂O presente nos filmes de gelatina de diferentes composições.

Composição (gelatina/glicerol)	H ₂ O (%)
1,0g / 0,2g ^a	5,94
1,0g/0,3g ^a	8,80
1,0g ^a	7,81
1,0g ^b	13,8

^a gelatina comercial da Sigma; ^b gelatina farmacêutica

Como observado nos dados da **Tabela 2**, o teor de água variou de 5,94-13,85%. Esta informação é importante, pois já está bem estabelecido de que as enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água para a manutenção da atividade catalítica.^{27,28}

Inicialmente, utilizou-se gelatina comercial da Sigma para preparação dos suportes. No decorrer da pesquisa foram testados outros tipos de gelatina, tais como a gelatina de pele de boi e de porco, além da farmacêutica nas mesmas composições da gelatina comercial da Sigma.

Os filmes formados com a gelatina de pele de porco e de boi não apresentaram resistência a fatores externos tais como umidade do ar, mostrando uma propensão maior ao aparecimento de fungos após aproximadamente 2 dias a partir de sua preparação. Os filmes obtidos com gelatina farmacêutica mostraram-

se muito mais resistentes à formação de fungos. Esta gelatina é mais solúvel em água, sendo necessárias temperaturas menores ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) para a solubilização e preparação do filme. Essa resistência a formação de fungos, possivelmente pode ser explicada devido uma maior pureza na gelatina farmacêutica em relação às demais.

Com base nesses resultados a gelatina comercial da Sigma e farmacêutica foram utilizadas como suporte para imobilização de lipases nas reações de transesterificação e esterificação.

4.2- Efeito do Solvente Orgânico no Filme de Gelatina

Definida a composição para a obtenção dos filmes de gelatina(item 4.1), foi realizado um estudo da estabilidade macroscópica do mesmo em meio orgânico, a fim de determinar a viabilidade de utilização destes como suporte de lipases.

Os solventes orgânicos testados foram hexano, heptano, acetonitrila, clorofórmio, diclorometano, MTBE e etanol a temperatura ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) durante 24h. Utilizaram-se filmes de gelatina comercial da Sigma, farmacêutica e as de pele de boi e porco, em composição de 1g de gelatina/0,3 mL de glicerol.

Os filmes mostraram-se estáveis nestes solventes, não apresentando alterações macroscópicas como mudanças na maleabilidade e resistência . Porém em etanol, após o tempo testado, o filme apresentou um aspecto esbranquiçado. O hexano foi inicialmente escolhido como meio reacional e as características dos filmes foram mantidas após 2 meses de estocagem e em baixas temperaturas ($\sim 4^{\circ}\text{C}$)

4.3- Efeito da Temperatura

Foi realizado também um teste para avaliar a influência da temperatura na estabilidade dos filmes. Estes foram colocados em hexano e aquecidos em banho-maria até aproximadamente 60°C (temperatura de ebulição do hexano). Após 30

min. não foram observadas alterações macroscópicas nos filmes, mostrando também a estabilidade destes até esta temperatura.

Para os testes descritos acima foram utilizados filmes sem adição de lipases e preparados com gelatinas das diversas procedências.

A seguir, serão apresentados os resultados obtidos para a obtenção do acetato de citroneila com a *Pseudomonas* sp (LPS) e *Rhizopus oryzae* (LRO) na forma livre e imobilizada em filme de gelatina comercial.

4.4- Preparação do Acetato de Citroneila com Lipases na Forma Livre e Imobilizada em Reações de Transesterificação

A influência da imobilização das lipases em filmes de gelatina foi realizado em sistemas contendo massas das lipases de *Pseudomonas* sp (LPS) e *Rhizopus oryzae* (LRO) entre 20-70 mg.

A **Tabela 3**, mostra os valores de conversão obtidos na reação de transesterificação do acetato de vinila com citrionelol. A reação foi realizada com quantidades equimolares de reagentes, sendo 5mmol de acetato de vinila e 5mmol de citrionelol com a LPS e LRO imobilizadas em filme de gelatina comercial (**Esquema 1**).

Tabela 3-Conversão em acetato de citroneila com a LPS/gelatina e LRO/gelatina.

Composição	C%			
	24h	48h	72h	96h
LRO (20 mg)	11,1	16,0	14,3	21,0
LRO (50mg)	25,0	45,0	44,4	44,3
LRO (70mg)	36,0	53,2	32,8	32,3
LPS (20mg)	39,0	30,3	36,0	37,6
LPS (50mg)	41,0	42,0	-	41,2
LPS (70 mg)	11,1	16,0	14,3	21,0

Determinado por RMN⁻¹, 35°C.

Os valores obtidos de conversão em acetato de citroneila variaram de 11,1-41,0% em 24h de reação. Após 96h de reação, obteve-se o éster com conversões de 21,0-44,3%. Não foi observado uma grande variação na conversão em função do tempo.

Ao utilizar 100 mg de LPS e LRO imobilizadas, as conversões em éster foram de 38,6 e 19,5% respectivamente, demonstrando que acima de 50mg começa a ocorrer o ponto de saturação na capacidade catalítica das lipases.

Em geral, estes experimentos demonstraram bons resultados, sendo que as melhores condições foram com 50mg de LRO, formando o produto com 44% em média. Os valores de conversão para a reação com 50mg de LPS em 72h não foi determinado devido erros experimentais.

Com o objetivo de avaliar a eficiência do método de imobilização aplicado, utilizaram-se as lipases LRO e LPS, 50 mg de cada, na sua forma livre para a obtenção do acetato de citroneila. O tempo reacional foi de 96 h a 35°C em 25 mL de hexano.

A **Tabela 4**, demonstra os resultados obtidos na conversão do acetato de citroneila com as condições experimentais discutidas acima.

Tabela 4: Conversão em acetato de citroneila com lipases livres ^(a).

Sistema	Conversão (%) ^(a)
LPS livre	23,1
LRO livre	15,3

(a) determinado por RMN-¹H, 96h, 35°C

Os resultados expostos na **Tabela 4**, mostram valores de conversão menores em relação à reação catalisada por lipases imobilizadas (**Tabela 3**). O uso das lipases na forma livre além de apresentarem a desvantagem de não poderem ser reutilizadas após a primeira utilização devido a dificuldade de separá-las do meio reacional, ficam sujeitas a alteração de sua conformação inicial e diminuição da capacidade catalítica, devido a influência do solvente orgânico.

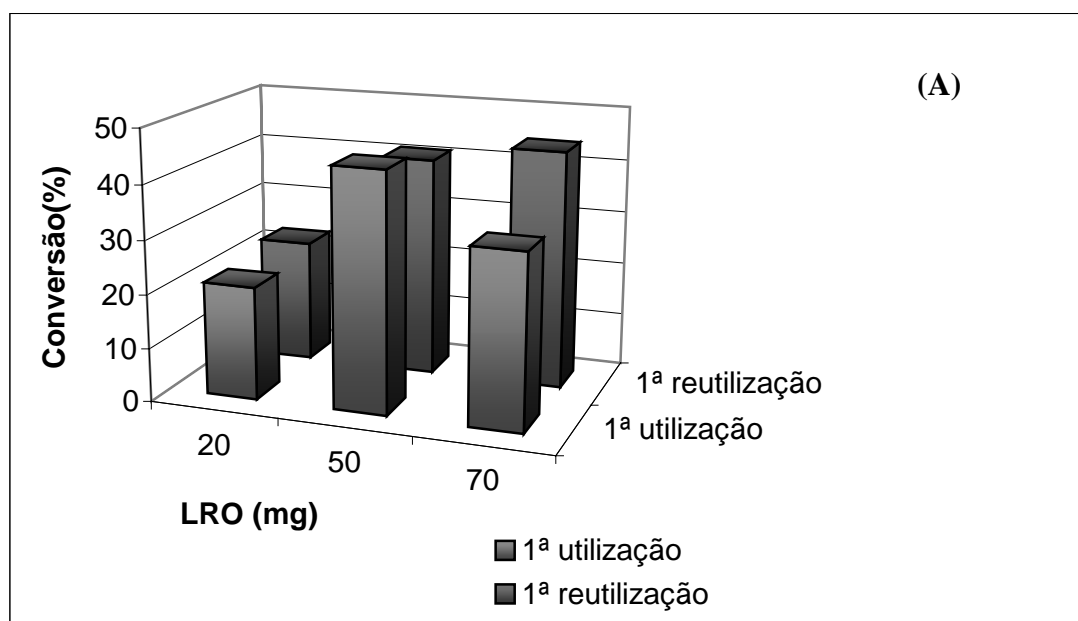
Essa mesma reação estudada foi realizada na ausência de lipases, nas condições anteriores. A conversão em acetato de citroneíla foi de 5,6%, salientando a influência do biocatalisador.

Portanto, estes resultados iniciais mostram que a imobilização é um procedimento vantajoso para o uso de biocatalisadores em meio aquo-restrito.

4.4.1 - Efeito da Reutilização dos Sistemas Lipases/Gelatina

Foi estudado o efeito de reutilização dos sistemas contendo as lipases LPS e LRO em filmes de gelatina, após a primeira utilização. Estas reações foram realizadas nas mesmas condições experimentais utilizadas anteriormente (item 4.4).

A **Figura 11 A e B**, compara as porcentagens de conversão em acetato de citroneíla para as reações catalisadas por LRO/gelatina (**Fig.11 A**) e LPS/gelatina (**Fig.11 B**) na primeira reutilização com os resultados apresentados anteriormente.



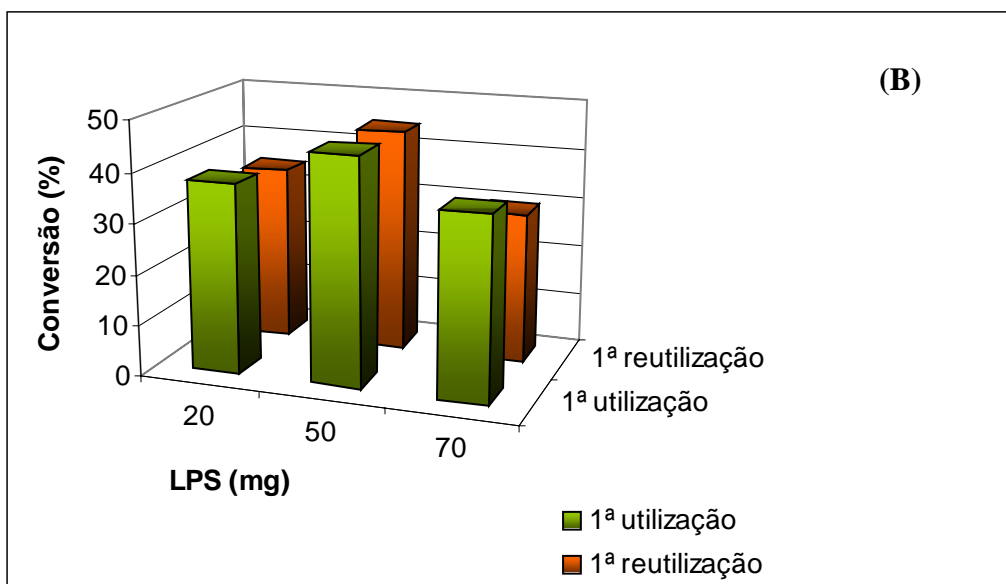


Figura 11- Conversão em acetato de citroneila na primeira utilização e primeira reutilização dos sistemas LRO/gelatina (A) e LPS/gelatina (B) (96h, 35°C).

Comparando os valores obtidos na 1ª reutilização, sendo de 30-45% e 22,8 - 44,4% com os sistemas LPS/gelatina e LRO/gelatina, respectivamente, observa-se que não houve diminuição na capacidade catalítica do biocatalisador. Para o sistema com 70 mg de LRO, observou-se um aumento na conversão em acetato de citroneila, indicando que pode ter permanecido resíduos do produto e/ou dos reagentes após as lavagens. O tempo de estocagem dos filmes com LPS foram de 30 dias a temperatura ambiente.

Para o sistema LRO/gelatina, observou-se o efeito de reutilização e o de estocagem em baixas temperaturas durante três meses a 4°C. Os filmes mantiveram suas características macroscópicas e a enzima sua atividade, mesmo após estocagem nesta temperatura, sendo esta mais uma vantagem do método de imobilização. Nestas condições o éster foi obtido com 19-35%, mostrando que também é possível a estocagem do filme com o biocatalisador a baixa temperatura.

4.5. Preparação de Alcanoatos de Citroneila com Lipases Imobilizadas em Reações de Esterificação

4.5.1-Efeito do tamanho da cadeia alquílica dos ácidos alifáticos na preparação de alcanoatos de citroneíla

Em uma segunda etapa deste trabalho estudou-se a reação de esterificação do citrônolol e com uma série de ácidos graxos de cadeia longa (C₃- propiônico, C₄-butírico, C₆-hexanóico, C₈-caprílico, C₁₀- decanóico, C₁₂- láurico, C₁₆- palmítico, C₁₈- esteárico e oléico) catalisada pela LPS (50mg) imobilizada em filme de gelatina comercial, para a obtenção de alcanoatos de citroneila (**Esquema 2**).

A **Figura 12**, demonstra os resultados obtidos nas reações realizadas com quantidades equimolares dos reagentes (5mmol de cada) em 25mL de hexano.

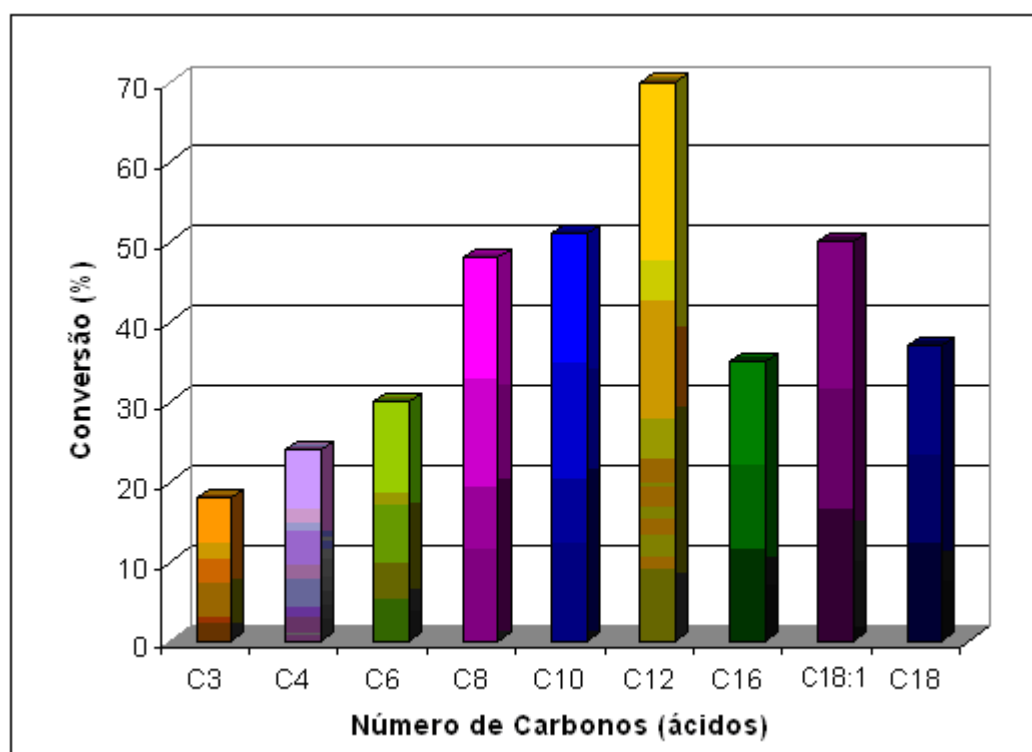


Figura 12 - Conversão em alcanoato de citroneila em relação ao número de carbonos nos ácidos, LPS (50mg), 48h, 35°C.

Os dados obtidos mostram que as conversões em alcenoatos de citroneila variaram de acordo com a cadeia alquílica dos ácidos, sendo de 18-70%. Para os ácidos até 12 carbonos, houve um aumento gradativo na formação dos produtos, de acordo com o aumento da cadeia carbônica. Este resultado pode ser explicado considerando o aumento do efeito hidrofóbico, e um melhor encaixe no sítio ativo da LPS. Os ácidos carboxílicos de cadeias carbônicas menores, podem alterar a conformação original da LPS, através da formação de um complexo acil-enzima mais estável.^{6,13}

Para ácidos de cadeias maiores que 12 carbonos, observa-se uma diminuição na quantidade de produto formado, sendo que os laurato, palmitato e estearato de citroneila foram obtidos com conversões de 70, 50 e 35%, respectivamente. Este resultado pode ser explicado considerando os efeitos estéreos devido o aumento da cadeia alquílica no ácido, o que dificulta a formação do complexo acil-enzima na primeira etapa da reação biocatalisada.^{13,15}

Resultados similares a estes foram observados por Nascimento *et al.*¹⁵ na esterificação do álcool amílico com esta mesma série de ácidos ,utilizando filmes de caseinato de sódio/glicerol como suporte para lipases.

4.5.2- Efeito da Reutilização dos Sistemas LPS/gelatina na Reação de Esterificação dos Ácidos Alifáticos

Os sistemas LPS/ gelatina foram reutilizados na reação de esterificação dos ácidos alifáticos com o citrônolol, nas mesmas condições citadas anteriormente no item 4.4.1. Na **Figura 13** os dados obtidos na da primeira utilização são comparados com os da primeira reutilização.

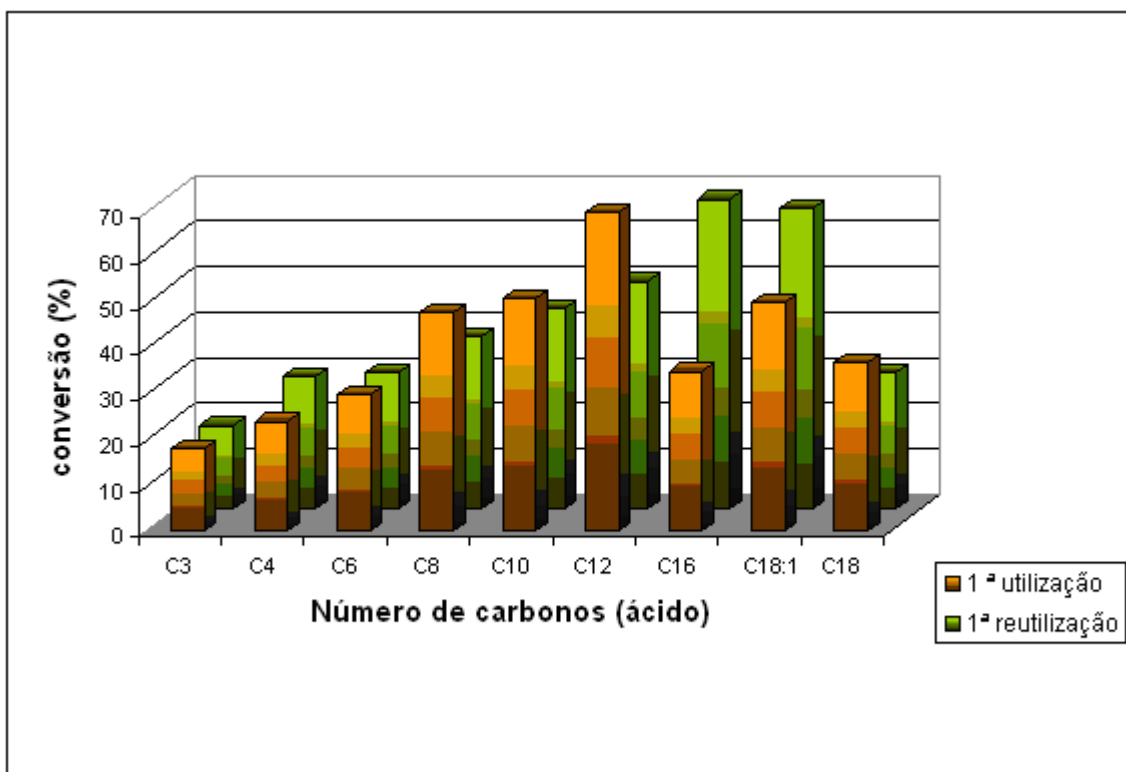


Figura 13- Conversão em alcenoatos de citrônio na primeira utilização comparada com a primeira reutilização, LPS (50mg), 48h, 35°C.

Os valores de conversão em produto na primeira reutilização dos sistemas LPS/ gelatina variaram de 18-68%, não havendo portanto perdas significativas. Em algumas reações, como no caso da esterificação dos ácidos butírico, esteárico e palmítico, nota-se o aumento de conversão na reutilização em relação a primeira utilização. Esse aumento pode ser explicado por possíveis resíduos de produto e/ou reagentes da primeira reação e que não foram eliminados totalmente do suporte, ocorrendo assim uma adição de produtos formados na segunda utilização.

Portanto, com base nos dados discutidos acima, confirmam-se as vantagens das técnicas de imobilização de lipases, e que vem sendo discutidas também em alguns trabalhos recentes da literatura.^{15,16,31} Estas atendem as expectativas iniciais do projeto, tais como a utilização da gelatina como suporte sendo este de fácil obtenção, não agressivo ao meio ambiente, econômico e pode ser reutilizável.

4.6. Esterificação de Ácidos Alifáticos com o Álcool Benzílico

Dando continuidade ao trabalho, prepararam-se ésteres alifáticos derivados do álcool benzílico. Para esse estudo utilizou-se somente três ácidos da série utilizada anteriormente, sendo um de cadeia carbônica pequena, outro intermediário e um de cadeia longa, sendo estes os ácidos propiônico, láurico e esteárico.

4.6.1. Efeito da polaridade do solvente orgânico na preparação de alcenoatos de benzila

Considerando os testes de estabilidade dos filmes de gelatina em diferentes solventes orgânicos (item 4.2), realizaram-se as reações de esterificação do álcool benzílico em diferentes solventes orgânicos. Para a avaliação do efeito do solvente orgânico selecionou-se neste estudo o heptano, clorofórmio, acetonitrila além do hexano já utilizado anteriormente.

As reações foram realizadas sob as mesmas condições das etapas anteriores, e os resultados obtidos estão demonstrados na **Tabela 5**.

Tabela 5- Conversão em alcenoatos de benzila em função da polaridade dos solventes orgânicos.

Solvente	Polaridade (log P)	Ác. Propiônico c (%)	Ac. Láurico c(%)	Ac. Esteárico c(%)
heptano	4,00	91,3	91,7	>99 %
hexano	3,50	85,4	90,8	83,9
clorofórmio	4,30	80,5	62,2	55,4
acetonitrila	0,33	76,7	52,6	---

Determinado por RMN-¹, 35°C, 48h

Freqüentemente usa-se o log P, definido por Laane *et al*²⁹ como logaritmo do coeficiente de partição do solvente no sistema octanol/água, para descrever

quantitativamente o efeito do solvente em reações catalisadas por enzimas . Os solventes que possuem $\log P \leq 2$ são hidrofílicos, não sendo adequados para biocatálise porque alteram fortemente a interação água/biocatalisador, tornando-o inativo ou ocasionando a desnaturação. Os solventes com $\log P$ entre 2 e 4 são também hidrofílicos, mas perturbam menos a interação água/biocatalisador. Os solventes com $\log P$ acima de 4 são hidrofóbicos, não alteram estas interações e deixam o biocatalisador no seu estado ativo.^{11, 29,30,31,32}

Observando os valores demonstrados na **Tabela 5**, observa-se, em geral, uma diminuição na conversão dos produtos conforme aumenta-se a polaridade do solvente. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos reportados na literatura, sendo que os solventes com maior $\log P$ formam os produtos em melhores conversões.^{13,15,33,34} Postula-se que estes solventes perturbam menos a estrutura nativa das enzimas, o que é necessário para a manutenção da atividade.

Realizou-se também a reação na ausência de catalisador do ácido esteárico com o álcool benzílico, nas mesmas condições citadas . Não houve conversão em éster, comprovando a eficácia do uso do catalisador.

4.6.2 . Efeito da Utilização de Diferentes Lipases na Obtenção dos Alcanoatos de Benzila

Afim de comprovar a eficiência da gelatina como método de imobilização, utilizou-se lipases de diferentes procedências na preparação dos sistemas. Para tal, utilizaram-se as lipases *Pseudomonas* sp. (LPS), *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Burkholderia cepacia* (PS-SD e PS-IM), *Aspergillus niger* (A), *Candida rugosa* (AY), *Mucor javanicus* (M). Todas formaram filmes estáveis e maleáveis juntamente com a gelatina e puderam ser aplicadas no meio reacional, para a obtenção de alcanoatos de benzila.

As condições experimentais foram mantidas, conforme citado no item 4.6.1 e o solvente foi o heptano, devido aos melhores resultados no teste dos solventes orgânicos. Os resultados de conversão em éster estão demonstrados na **Tabela 6**.

Tabela 6- Utilização de lipases de diferentes procedências na obtenção dos alcenoatos de benzila

Lipases (50mg)	Ác. Propiônico c (%)	Ác. Láurico c (%)	Ác. Esteárico c (%)
A	29,2	7,3	4,0
AY	72,4	85,5	79,4
AK	73,0	87,7	94,0
M	30,8	78,7	92,0
PS-SD	88,5	90,1	92,0
PS-IM	84,7	90,1	82,0
LPS	82,2	90,1	92,6

Determinado por RMN-¹, 35°C , 48h;

Ao observar os dados da **Tabela 6**, observa-se que somente a lipase A formou o produto com conversão baixa, fornecendo os laurato e estereato de benzila com 7,3% e 4,0% respectivamente. Estes valores são muito inferiores aos observados com as outras lipases.

Outra observação importante é sobre a reutilização dos sistemas utilizados. Para a reação com o ácido propiônico, todos os sistemas foram reutilizados de outras reações, com exceção do sistema com a lipase M. O que observa-se são valores entre 29,2-88,5% , muito acima do esperado (~30,0%). Estes podem ser explicados por possíveis resíduos dos outros ésteres que não foram completamente removidos dos filmes, mesmo após sucessivas lavagens e que não foram detectados por cromatografia de camada delgada .

Os laurato e estereato de benzila foram obtidos com uma boas conversões, estando dentro dos valores esperados.

Esses resultados nos levam a concluir que nos sistemas utilizados nas reações de esterificação não se recomenda a reutilização para reações diferentes, pois é muito difícil remover totalmente o produto remanescente de outras

utilizações, sendo portanto uma desvantagem aparente do método. Para resolver este problema, uma alternativa seria lavar os filmes com solventes mais polares do que os utilizados na reação.

Em geral, os resultados obtidos mostram a viabilidade de utilizar a gelatina como suporte para imobilização de lipases e/ou de outros biocatalisadores

4.7. Tratamento dos Resíduos e dos Produtos

Atualmente, as constantes discussões sobre as condições ambientais do planeta nos fazem adotar uma postura coerente dentro dos grupos de pesquisa quanto a questão dos resíduos gerados.

Desta forma, durante a pesquisa os solventes utilizados em maior demanda, como o hexano e o heptano, foram tratados através de destilação fracionada. Os solventes foram coletados em temperaturas de 68°C para o hexano e 98°C para o heptano, sendo referentes ao ponto de ebulição dos mesmos e o índice de refração dos solventes destilados foram determinados apresentando valores de 1,387 e 1,379 respectivamente. Esses valores são condizentes com dados da literatura ³⁵, certificando a pureza dos mesmos. Após esse processo utilizou-se os solventes para lavagem dos sistemas na remoção do produto e limpeza dos sistemas para posterior reutilização .

Os sistemas lipase/gelatina puderam ser descartados sem um tratamento específico por serem biodegradáveis e os ésteres obtidos estão armazenados para usos posteriores.

5- CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesta pesquisa, as principais conclusões são:

- ✓ Os filmes de gelatina foram considerados bons suportes para imobilização de lipases, sendo constatando boa estabilidade em heptano, hexano, éter metil t-butilico (MTBE), clorofórmio, acetonitrila, diclorometano e etanol
- ✓ As conversões em acetato de citroneila foram de 11,1- 44,3%, sendo portanto considerado satisfatório.
- ✓ As conversões em alcenoatos de citroneila foram de 18-70%, e mostraram a dependência da cadeia alquílica do ácido carboxílico e da polaridade do solvente.
- ✓ Lipases de diversas procedências foram imobilizadas em filmes de gelatina, e as mais efetivas para a obtenção de alcenoatos de citroneila foram as LPS, AY, AK, M, PS-SD e PS-IM.
- ✓ A reutilização dos filmes de gelatina mostrou-se eficiente somente para os sistemas utilizados na transesterificação, sendo que os mesmos mantiveram sua capacidade catalítica praticamente inalterada e os produtos foram obtidos com conversões de 9-42%.
- ✓ A gelatina mostrou ser um bom suporte para imobilização de lipases.

6- PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar a conversão em ésteres em função da temperatura, sendo que serão testadas outras abaixo e acima das utilizadas até o momento;
- ✓ Avaliar o efeito da imobilização de lipases em gelatina e testá-las em reações com outros substratos.
- ✓ Aplicar os sistemas lipases/gelatina em reações de resolução com álcoois racêmicos para a obtenção de produtos quirais..

7- REFERÊNCIAS

-
- 1 -J. Dubos; *Trends Biotechnol.*, 13 (12),511-515, **1995**.
 - 2 -<http://pt.wikipedia.org/wiki/Enzimas> , acessado em 05/06/2008.
 - 3 -Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; *Fundamentos de Bioquímica*, 4, 77-121, **2000**.
 - 4 -Nelson D.L.; Cox, MM.; Lehninger; *Principles of Biochemistry*, 8, **2000**.
 - 5 -Faber, K. *Biotransformations in Organic Syntesis*. 3ª Ed. Verlag Berlin, 3-8, **1997**.
 - 6 -Sharma R., Chisti Y., Banerjee C.U.; *Biotechnol. Adv.* ,19 627-662, **2001**
 - 7 -Stamatis,H; Xenakis,AJ. ; *J.Mol. Catal.B : Enzym.*; 6,399-406, **1999**
 - 8 -Chang, S.W. , Shaw J.F. , Shieh C.H . Shieh C.J; *J.Agric. Food Chem*, 54, 7125-7129, **2006**
 - 9 -Hasan, F.; Shah, A.A.; .Hameed, A.; *J.Mol.Catal.B: Enzym*, 39 235-251 , **2006**
 - 10 -Costa, V.E.U.; Amorim L. H.N; *Quím. Nova* , 22 863-873, **1999**
 - 11 -Costa, V.E.U.; Amorim L. H.N; *Quím. Nova* , 22 863-873, **1999**
 - 12- Fernández, V.G ; Brieva, R.; Godor, V.; *J.Mol.Catal.B: Enzym*, 40 111-120 **2006**
 - 13 -Dalla-Vecchia, R.; Sebrão, D.; Nascimento, M.G, Soldi; V. *Process Biochem.* 40 2677-2682 **2005**.
 - 14 -Costa, V.E.U.; Amorim L. H.N; *Quím. Nova* , 22 863-873, **1999**
 - 15- Sebrão, D.; Silva,V. D.; Nascimento, M. G.; Moreira, M. A.; *Quím.Nova*, 30(5) 1182-1187 **2007**.
 - 16 -Ghanem, A. , *Tetrahedron Lett.*; 63 ,1721-1754; **2007**

-
- 17 -Blanco, R.M.; Terreros, P.; Munõz, N.; Serra, E.; *J.Mol.Catal.B: Enzym*, 47 13-20 **2007**
- 18 -Clark, A.H; Ross-Murphy, S.B; *Adv.Polymer Sci.* 83, 107-115,**1987**
- 19 -Murray, R. K.; Granner, D. K.; Harper; *Bioquímica*, 6^a Ed., cap. 7, Atheneus, SP, **1990**.
- 20 -<http://www.lsbu.ac.uk/water/hygel.html>, acessada em 5/06/2008.
- 21- Di Stasi, L.C.; *Plantas Medicinais: Arte e Ciência* ;Ed.Unesp, cap. 9, 120-126.
- 22- Chiappe, C.; Leandri, E.; Lucchesi, S.; Pieracino, D.; Hammock, B.D.;Morisseau, C.; *J.Mol.Catal.B: Enzym.* ,27,243, **2004**
- 23- Athawale, V.; Manjrekar, N.; Athawale, M.; *Tetrahedron Lett.*, 43, 4797-4800, **2002**.
- 24- http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_graxo ,acessado em 05/06/2008.
- 25- <http://www.amano-enzyme.co.jp/eng/index.html> , acessada em 05/06/2008.
- 26-http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/synthe_e/cat_synthe_LPSPD-30_e.pdf,
acessado em 05/06/2008.
- 27 - Forestim ,M.L., Pedernera, M., Bucalá. V.e Ferreira, M.L. ; *Enzyme. Microb. Technol.* , 41, 1-2, 62-70 **2007**
- 28- Bhalchandra, K. Vaidya and Rekha S. Singhal, *Colloids Surf. B:* ;article in press
- 29 -Laane, C.; Boeren, S.; Veger, C.; *Biotechnol. Bioeng.* 30, 81 **1987**,
- 30 - Villeneuve, P., *Biotechnol. Adv.* ; 25 6 515-536, **2007**,
- 31 - Pahujani, S, Kanwar, S., Chauhan, G., Gupta R.,, *Biotechnol. Adv.*, 99, 7, 2566-2570, **2008**,

-
- 32 - Nara, S. J, Harjani, J. R, Salunkhe, M. M.; *Tetrahedron Lett.*
43 (16) 2979-298215, **2002**,
- 33 -Bezbradica, D.; Mijin, D.; Siler-Marinković, S.; Knezević, Z. ; *J.Mol.Catal.B: Enzym*, 45 97-101 **2007**
- 34 -Tamalampudi, S.; Hama, S.; Tanino, T., Talukder, M.R.; Kondo, A.; Fukuda, H., *J.Mol.Catal.B: Enzym*, 48 33-37, **2007**.
- 35 -Fluka, *Laboratory Chemicals and Analytical Reagents*, 948;964. **2005/2006**

8. ANEXOS

Com os resultados dos trabalhos desenvolvidos até a presente data, foram apresentados 1 (um) trabalho na 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ (31 de maio a 03 de junho de 2007 – Águas de Lindóia – SP), 1 (um) trabalho no XVII Seminário de iniciação científica – SIC (2 a 4 de outubro de 2007 - Florianópolis - SC), 2 (dois) trabalhos no XV Encontro de Química da Região Sul – SBQ Sul (15 a 17 de novembro de 2007 – Ponta Grossa - PR). Serão apresentados 2 trabalhos no IV **Workshop** de **Biocatálise** e Biotransformação (15-18 de julho de **2008** São Carlos – SP)

As cópias dos mesmos estão anexadas a seguir.